

**Tierexperimentelle Studien
mit einem synthetischen ACTH-Präparat**

von
Karl Cerny
aus Öhringen

Aus der Abteilung für klinische Immunologie des
Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. med. F. Scheiffarth

TIEREXPERIMENTELLE STUDIEN MIT EINEM
SYNTHETISCHEN ACTH-PRÄPARAT

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der
FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
zu
ERLANGEN-NÜRNBERG

vorgelegt
von
Karl Cerny
aus
Öhringen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Professor Dr. med. dent. A. Kröncke

Referent: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 1969

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG..... 1

VERSUCHSANORDNUNG UND METHODIK..... 3

ERGEBNISSE..... 7

DISKUSSION..... 12

ZUSAMMENFASSUNG..... 18



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546305_0010

TIEREXPERIMENTELLE STUDIEN MIT EINEM SYNTHETISCHEN ACTH-PRÄPARAT*

EINLEITUNG

Die in der klinischen Medizin bereits seit langem ausgenutzte günstige Wirkung von nebennierenrinden-stimulierenden Hypophysenhormonen vor allem zur Hemmung mesenchymaler Hyperplasien, wie sie bei Kollagenosen, Autoimmunisierungskrankheiten sowie bei malignen Erkrankungen des lympho-plasmo-reticulären Systems Anwendung findet, hat der pharmakologischen Industrie die bisher nicht ganz einfache Aufgabe einer Reindarstellung dieses Hormons gestellt.

Seit der Entdeckung von P.E.SMITH (21) im Jahre 1926, daß die Hypophyse eine gezielte Wirkung auf die Nebennierenrinde ausübt, war bis zum Jahre 1942 mit Bezug auf die Aufklärung der Eigenschaften dieses Hypophysenstoffes kein entscheidender Fortschritt erfolgt. Zu diesem Zeitpunkt gelang es EVANS (16), LONG, SAYERS (19) und TYSLOWITZ (24) das ACTH von den anderen Hormonen abzutrennen und somit isoliert darzustellen.

Bisher verwendete ACTH-Präparate bestanden aus weitgehend gereinigtem Corticotropin, das aus den Hypophysen von Schwein oder Rind gewonnen wurde. Sie haben den Nachteil, daß die Qualität von dem vor-

* Cortrosyn Depot.pack.no.575065 v.V.ORGANON-OSS.,Holland

liegenden Drüsenmaterial abhängt, wodurch es schwer zu standardisieren ist. Außerdem kann der Reinheitsgrad durch Beimengung anderer Hypophysenhormone beeinträchtigt werden, sowie auch die Gefahr einer allergisierenden Wirkung auf Grund der Polypeptidnatur besteht (10).

Es bestand deshalb seit langem der Wunsch, diese zu Nebenwirkungen fähigen Faktoren durch Synthetisierung des ACTH auszuschließen. Gleichzeitig würde damit ein exakter produzierbares und leicht standardisierbares Präparat zur Verfügung stehen.

In der Tat gelang es 1961 KAPPELER und SCHWYZER (11), ein Tetracosapeptid zu synthetisieren, welches die ersten 24 spezifisch wirksamen der 39 Aminosäuren des natürlichen adrenocorticotropen Hormons enthält.

Die an einem eigenen Krankengut* gesammelten klinischen Erfahrungen mit einem synthetisierten ACTH-Präparat bei Patienten mit chronisch entzündlichen Affektionen (primär chronische Polyarthrititis, Lupus erythematodes, Asthma bronchiale, Kollagenosen) mit dem Resultat sehr guter, objektivierbarer und anhaltender therapeutischer Effekte haben uns veranlaßt, den Wirkungsmechanismus dieses Präparates tierexperimentell zu überprüfen. Dabei sollte vor allen Dingen die Frage einer antigenen Wirkung mit eventuellen Sensibilisierungserfolgen berücksichtigt werden.

* Unveröffentlichte Erfahrungen an der Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg

VERSUCHSANORDNUNG UND METHODIK

1. Versuchsanordnung

Es wurden insgesamt 5 Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 2000 g in Versuch genommen. Zwei von diesen Tieren wurden mit Cortrosyn (K_{C1} , K_{C2}), zwei weitere mit dem Emulgat aus Cortrosyn (K_{CF1} , K_{CF2}) und FREUNDSchem Adjuvans (FA) behandelt, das fünfte Kaninchen erhielt nur FREUNDSches Adjuvans appliziert (KF).

Vor Versuchsbeginn, sowie in Abständen von jeweils 14 Tagen wurden den Tieren aus einer Ohrvene etwa 7 ml Blut entnommen, zentrifugiert und das hämolysefreie Serum folgenden Untersuchungen unterworfen:

Zweidimensionale Immunodiffusion nach OUCHTERLONY, passive Hämagglutination nach BOYDEN, Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien (CAF) sowie Immuno-elektrophorese.

Außerdem wurden sämtliche Tierseren auf ihren Gehalt an Lipiden und Blutzucker analysiert.

Bei allen Tieren wurde bei jeder Kontrolluntersuchung der Intracutantest mit

- a) Histamin
- b) Cortrosyn
- c) FREUNDSchem Adjuvans
- d) FREUNDSchem Adjuvans und Cortrosyn

durchgeführt.

Nach Abschluß der Sensibilisierungsserie wurden die Tiere noch weitere zwei Wochen ohne Behandlung beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurden nochmals sämtliche Serumanalysen vorgenommen. Schließlich wurden die Tiere getötet und folgende Organe für die histologische Befundung entnommen: Nebennieren, Milz und Leber.

2. Methodik

- a) Zweidimensionale Immunodiffusion

Es wurde die von OUCHTERLONY beschriebene Technik (18) gewählt. Jedes Serum wurde unverdünnt sowie in geometrischen Verdünnungen bis zu 1 : 64 im Rosettentest jeweils gegen Cortrosyn, Cortrosyn und FREUNDsches Adjuvans sowie gegen FREUNDsches Adjuvans allein angesetzt.

b) Passive Hämagglutinationsreaktion

Die passive Hämagglutinationsreaktion wurde zum Nachweis agglutinierender Antikörper gegen Cortrosyn nach den Angaben von BOYDEN (2) vorgenommen.

c) Intracutantest

α) Direkter Intracutantest

Den Versuchstieren wurde jeweils nebeneinander 0,1 ml Histamin, Cortrosyn, FREUNDsches Adjuvans mit Cortrosyn und FREUNDsches Adjuvans allein subcutan injiziert. Nach 30 min. wurde die lokale Reaktion beurteilt, wobei vor allem das Ausmaß einer eventuellen Quaddelbildung ausschlaggebend ist.

β) Indirekter bzw. passiver Intracutantest

Hier wurde einem unbehandelten Kaninchen das Serum eines mit Cortrosyn behandelten Tieres intracutan appliziert und anschließend eine Antigeninjektion vorgenommen. Das Mengenverhältnis betrug je 0,1 ml des unverdünnten Serums bzw. unverdünnten Cortrosyns im Vergleich mit FREUNDschem Adjuvans.

d) CAF-Elektrophorese

Die CAF-Elektrophorese wurde nach den Angaben von KOHN (13) ohne Modifikation vorgenommen. Im einzelnen wurde dabei eine gebräuchliche Elektrophoresekammer* mit einem Veronalpuffer mit pH 8,6

* Multielektrophoresekammer der Fa. Dr. BENDER und Dr. HOBEIN, München

Ionenstärke $\mu = 0,05$, sowie handelsübliche CAF-Folien mit den Abmessungen 18 x 160 mm* verwendet. Die Proteinfärbung erfolgte mit Amidoschwarz 10B, die Auswertung der gefärbten Streifen mit einem Photometer**.

e) Immunoelktrophorese

Die Immunoelktrophorese wurde zur Aufklärung von Veränderungen von Gammaglobulinfractionen nach den Angaben von GRABAR und WILLIAMS (6), bzw. SCHEIDEGGER (20) durchgeführt. Als Antiserum diente ein polyvalentes Anti-Kaninchen-serum***.

f) Laborchemische Untersuchungen

Die Gesamteiweißbestimmung, Fettstatus und Nachweis der Mineralien wurde nach den üblichen klinisch-chemischen Verfahren vorgenommen****.

g) Sensibilisierungsmodus

Die Sensibilisierung mit Cortrosyn, bzw. des Emulgats aus Cortrosyn und FREUNDSchem Adjuvans sowie mit FREUNDSchem Adjuvans allein erfolgte nach dem in Abb.1 wiedergegebenen Plan. Die Einzeldosen pro Tier und Injektion betrugen konstant für das reine Cortrosyn 0,0005 mg pro g Körpergewicht (2000 g - 1 ml). Mit Bezug auf Cortrosyn wurde die gleiche Dosis auch in der

* SELECTA-Elektrophoresefolien zur Elphor-Kurzzeit-Elektrophorese der Fa.Dr.BENDER und Dr.HOBEIN,München.
** Integralschreiber der Fa.Karl ZEISS, Oberkochen, Nr.19900 bzw. 25295.
*** Kaninchenantiserum von der Ziege der Fa.HYLAND, Los Angeles,Vertrieb TRAVENOL INTERNATIONAL,München.
**** Die laborchemischen Untersuchungen wurden uns freundlicherweise vom zentralen Laboratorium der Universitätskliniken Erlangen-Nürnberg (Leiter: Dr.DITMEYER) ausgeführt.

Gruppe, die mit dem Emulgat aus Cortrosyn und FREUNDschem Adjuvans behandelt wurde, gewählt, jedoch betrug das Volumen für jede Injektion dieser Gruppe 2,0 ml. FREUNDsches Adjuvans allein wurde pro Tier und Injektion in einer Menge von 1,0 ml appliziert.

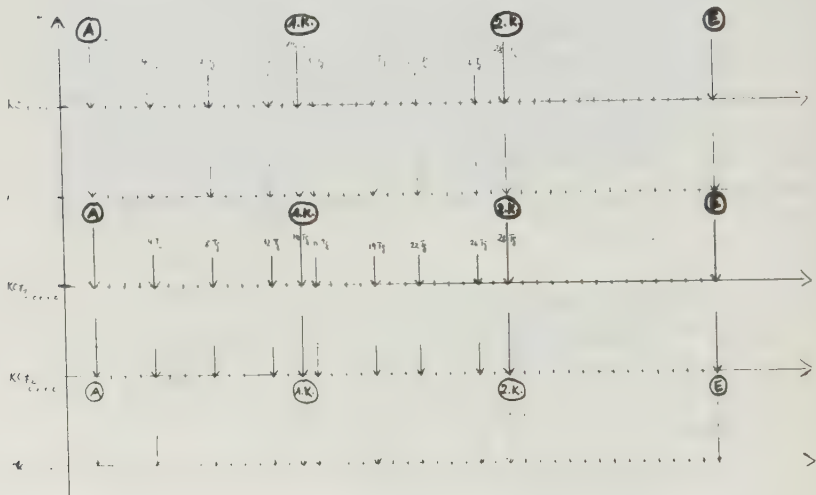


Abb. 1 zeigt den zeitlichen Ablauf der Versuchsserie
an 5 Kaninchen

h) Histologische Befundung einzelner Organstrukturen

Nach Abschluß der Beobachtungszeit wurden die Tiere getötet und folgende Organe für die feingewebliche Untersuchung entnommen: Nebennieren, Milz, Leber. Die Organe wurden in 10 %-ige Formalinlösung eingelegt und bis zur vollständigen Härtung 10 Tage belassen. Danach wurden Schnitte angefertigt und in üblicher Weise mit Hämatoxylin-Ersin gefärbt und bei einer Vergrößerung von 6,3/0,20; 10/0,30; 16/0,40 im Mikroskop* beurteilt.

* ZEISS-Binocular, Oberkochen.

ERGEBNISSE

1. Zweidimensionale Immunodiffusion

Die Befunde mit der OUCHTERLONY-Technik haben in keinem Fall und zu keinem Zeitpunkt eine positive Reaktion gezeigt. Es waren also sowohl die Seren der nicht behandelten Tiere bei Testung gegen freies Cortrosyn, gegen das Emulgat aus Cortrosyn und FREUNDschem Adjuvans (F.A.) wie auch gegen F.A. allein, als auch die Seren der drei Kontrolluntersuchungen nach Behandlung der Tiere ohne Nachweis eines Präzipitats geblieben. Dabei wurden, wie in der Versuchsordnung (Seite 3) angegeben, die einzelnen Tierseren jeweils unverdünnt und in Verdünnungen von 1 : 2 bis 1 : 64 angesetzt, so daß auch geringe Antikörperkonzentrationen hätten erfaßt werden können.

2. Passive Hämagglutinationsreaktion

Die Seren, die vor Versuchsbeginn untersucht wurden, zeigten in keinem Fall eine positive Hämagglutination. Das bezieht sich auf jede der vorgenommenen Untersuchungsreihen, die mit Cortrosyn, dem Emulgat aus Cortrosyn und F.A. sowie mit F.A. allein vorgenommen wurden. Die Kontrollanalysen am Ende der Versuchsreihe ergaben in der Gruppe der K_C sowie der K_{CF} -Tiere positive Reaktionen bei Serumverdünnungen von 1 : 2 und 1 : 4. Das Kontrolltier blieb völlig negativ.

3. Intracutantest

a) Direkter Intracutantest

Während im Ausgangsversuch an den noch nicht behandelten Tieren lediglich bei Histamin eine Quadrelbildung von 3 mm Durchmesser nachweisbar wurde, ergaben die mitgetesteten Lösungen von Cortrosyn,

Emulgat aus Cortrosyn und F.A. sowie F.A. allein in keinem Fall eine Quaddelbildung nach 30 min. Latenzzeit. Desgleichen konnte zum Zeitpunkt der Kontrollen 1 und 2 außer bei Histamin keine Quaddelbildung wahrgenommen werden.

β) Indirekter Intracutantest

Auch hier ergab sich in keinem Fall eine positive Reaktion.

4. CAF-Elektrophorese

Die Ausgangswerte der Serumelektrophoresen entsprechen weitgehend den in der Literatur angegebenen Normalbefunden. Es fiel lediglich auf, daß mit der hier verwendeten CAF-Elektrophorese zwischen Albuminen und β 1-Globulinen insgesamt 3 anstatt 2 α -Globulinfraktionen in Erscheinung traten.

Verfolgt man die Werte über die erste und zweite Kontrolle, so fällt bei allen Tieren mit Ausnahme der Kontrolle ein Abfall der Albumine mit relativer Vermehrung sämtlicher Globuline einschließlich der γ -Globuline auf. Das Kontrolltier, das lediglich F.A. appliziert bekam, zeigte zwar auch einen geringfügigen Abfall der Albumine, im übrigen aber nur eine relative Zunahme der β 1-Globuline. Die Befunde sind in Tab.1 zusammengestellt.

5. Immunoelktrophorese

Die mit der Immunoelktrophorese erhaltenen Serumproteinpräzipitate der nicht behandelten Tiere entsprachen dem Präzipitationsmuster normaler Kaninchen. Während das Kontrolltier im Verlauf des Versuchs keine erkennbaren Unterschiede gegenüber dem Ausgangsbefund aufwies, fiel vor allem unter den Tieren der Gruppe K_C - also der Tiere, die ausschließlich mit ACTH behandelt wurden - eine Reduzierung im γ -Globulinbereich auf. Betroffen war dabei allerdings nicht die γ -Globulinfraktion, die mit

85 % den Hauptanteil der γ -Globuline ausmacht, sondern Subfraktionen, die auch normalerweise in nur geringer Konzentration vorliegen.

In der Gruppe K_{CF} hingegen waren nahezu die gleichen Verhältnisse wie im Normalserum anzutreffen.

6. Befunde der laborchemischen Untersuchungen

a) Gesamtlipide und Gesamtcholesterin

Die Ausgangswerte für Gesamtlipide lagen bei allen Tieren zwischen 80 und 190 mg%. Das Kontrolltier, das lediglich F.A. appliziert bekam, zeigte über die gesamte Beobachtungszeit hinweg gleichbleibende Werte für die Gesamtlipide sowie für das Gesamtcholesterin (vgl. Tab.2 und Abb. 2+3).

Die Tiere der Gruppe K_C , die Cortrosyn ohne F.A. injiziert bekamen, zeigten einen deutlichen Anstieg in ihrem Gesamtlipidgehalt sowie eine Zunahme auch des Gesamtcholesterins. Die Tiere der Gruppe K_{CF} zeigten ebenfalls einen Anstieg der Gesamtlipide, gering auch des Gesamtcholesterins, die Werte lagen jedoch deutlich unter denjenigen der Gruppe K_C (vgl. Tab.2 und Abb. 2+3).

b) Blutzuckerwerte

Die Blutzuckerwerte der nicht behandelten Tiere lagen zwischen 0 und 8 mg%. Während Kontrolltier und die Kaninchen der Gruppe K_{CF} nur geringfügige Schwankungen bis max. 12 mg% aufwiesen, zeigte sich unter den Tieren der Gruppe K_C ein kontinuierlicher Anstieg bis auf Werte von 110 und 150 mg% am Ende der Beobachtungszeit (vgl. Tab.2 und Abb.4).

Tier Lfd.Nr.	Kontrollen	CAF-Elektrophorese							Alb. / Glob.
		Alb.	Globuline						
			α_1	α_2	α_3	β_1	β_2	γ	
K	A	70,2	1,8	3,5	1,8	8,8	3,5	10,5	2,33
	1.K	66,2	1,5	2,9	4,8	11,3	3,9	9,5	2,00
	2.K	66,7	1,3	2,5	4,0	14,7	1,3	9,3	2,03
K _{c1}	A	66,7	1,0	2,9	4,8	13,3	1,9	9,5	2,01
	1.K	53,6	1,8	3,6	5,4	12,5	5,4	17,6	1,16
	2.K	51,0	2,0	3,1	10,2	18,4	3,1	12,2	1,04
K _{c2}	A	68,6	1,1	2,2	5,5	12,5	1,1	9,0	2,18
	1.K	63,1	3,1	3,1	4,6	12,2	1,5	12,2	1,72
	2.K	60,6	2,0	3,0	6,1	16,2	2,0	10,1	1,53
K _{cF1}	A	62,5	1,6	2,3	7,0	14,8	2,3	9,4	1,67
	1.K	60,8	2,5	2,5	3,8	15,1	3,8	11,4	1,50
	2.K	51,7	1,7	3,4	8,5	15,5	5,2	13,8	1,07
K _{cF2}	A	65,7	1,9	1,9	6,7	14,3	1,9	7,6	1,89
	1.K	58,6	1,2	2,4	9,8	13,4	3,7	11,0	1,41
	2.K	58,2	2,0	4,0	8,0	12,1	4,0	11,6	1,38

Tab. 1 zeigt das Verhalten der Serumeiweißkörper gemessen an der CAF-Elektrophorese (rel.%)

Tier	Kontrolle	Lipide (mg %)	Cholesterin (mg %)	Blutzucker (mg %)
K _F	Ausgangswert	80	50	8
	1.Kontr.	90	40	0-1
	2.Kontr.	70	90	0-1
	3.Kontr.	80	60	6
K _{C1}	Ausgangswert	80	90	2
	1.Kontr.	80	110	1
	2.Kontr.	190	90	1
	3.Kontr.	330	100	150
K _{C2}	Ausgangswert	190	80	2
	1.Kontr.	430	80	26
	2.Kontr.	560	160	48
	3.Kontr.	1260	200	112
K _{CF1}	Ausgangswert	110	90	0-1
	1.Kontr.	70	60	2
	2.Kontr.	100	70	0-1
	3.Kontr.	180	60	1
K _{CF2}	Ausgangswert	80	60	1
	1.Kontr.	100	70	8
	2.Kontr.	200	90	12
	3.Kontr.	390	100	9

Tab. 2 zeigt den Serumgehalt an Cholesterin, Lipiden und Blutzucker bei den verschiedenen Kontrollen an den Versuchstieren K_F, K_{C1}, K_{C2}, K_{CF1}, K_{CF2}.

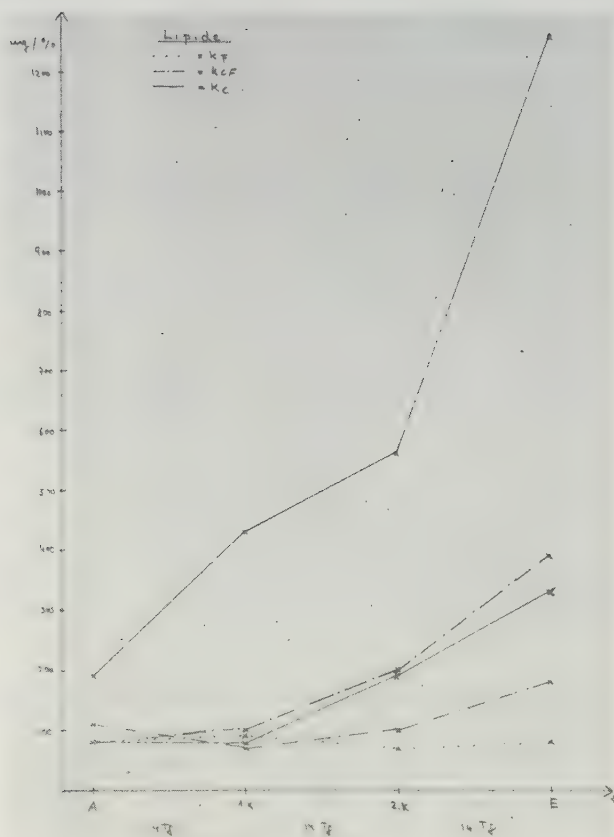


Abb. 2 zeigt den Serumgehalt an Lipiden bei den verschiedenen Kontrollen

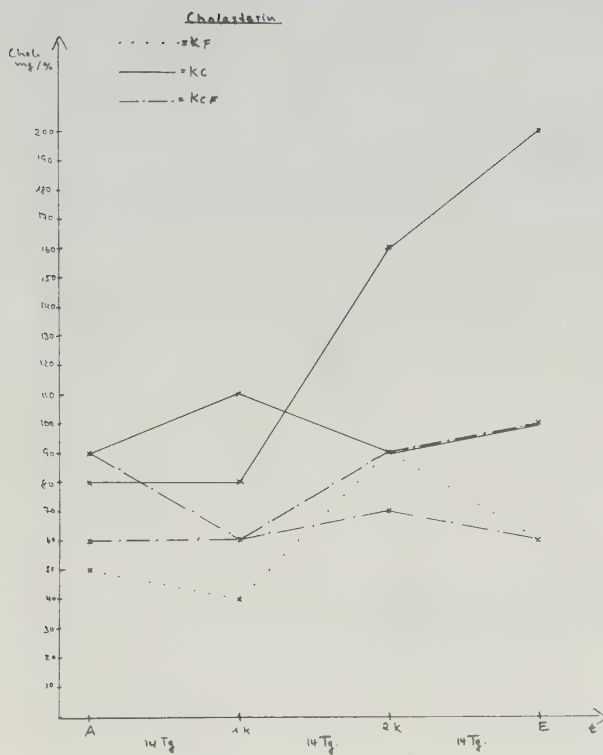


Abb. 3 zeigt den Serumgehalt an Cholesterin bei den verschiedenen Kontrollen

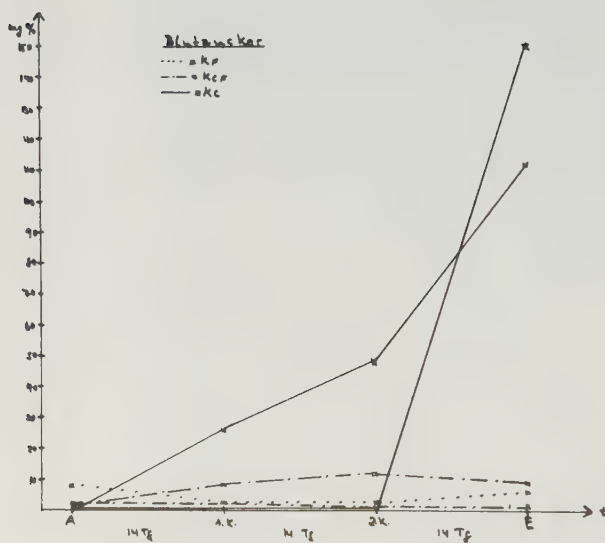


Abb. 4 zeigt den Serumgehalt an Blutzucker bei den verschiedenen Kontrollen

7. Beurteilung der entnommenen Organe (Nebenniere, Milz, Leber)

Bei Beurteilung des Situs der getöteten Tiere fielen folgende Besonderheiten auf:

Das Kontrolltier, ebenso wie die Kaninchen, die mit dem Emulgat aus Cortrosyn und F.A. behandelt wurden, zeigten an sämtlichen Abdominalorganen, aber auch an den Organen des Thoraxraumes einen milchig-trüben, fein gekörnten Überzug, der beim Kontrolltier nur gering, bei den Tieren der Gruppe K_{cF} auffallend intensiv in Erscheinung trat. Entzündungsphänomene oder Ergußbildungen waren nicht nachweisbar. Weiterhin imponierte an den Tieren der Gruppe K_c eine deutliche Vergrößerung jeweils beider Nebennieren, die auch unter Berücksichtigung der Gesamtgröße der Tiere einer echten Hypertrophie gleichzusetzen ist. Während das Kontrolltier und die Kaninchen der Gruppe K_{cF} Nebennierenorgane mit den Ausmaßen von max. 1,3 x 1,0 cm aufwiesen, zeigten beide mit Cortrosyn behandelten Kaninchen gleichermaßen Nebennierenorgane in den Größenordnungen 2,2 x 1,6 cm bzw. 2,5 x 1,8 cm. Histologisch ergab sich:

Bei dem Kaninchen, das lediglich FREUNDsches Adjuvans appliziert bekam, erwies sich bei Betrachtung der Nebenniere das Verhältnis von Rinde zu Mark als physiologisch. Auch die einzelnen Zellstrukturen zeigten keine Besonderheiten, keine Nekrosen, auch keine Zellinfiltrationen durch fremde Elemente. Die Milz dieses Tieres zeigte ebenfalls physiologische Struktur. Bei der Leber konnten vereinzelt Leberzellnekrosen sowie stärkere periportale Infiltrationen festgestellt werden.

Die Tiere der Gruppe K_c zeigten mit Bezug auf die Nebenniere eine deutliche Verbreiterung der Rinde zugunsten des Marks (etwa um das 3-fache des Normalen). Die Granulierung der Rindenzellen war in-

tensiviert. Dabei war außerdem die Grenze zwischen Mark und Rinde nicht mehr exakt zu fassen, schließlich ließen sich im Bereich des Markes einwandfrei insuläre Infiltrationen von Rindenzellen erkennen. Die Kapsel zeigte eine bindegewebige Verdichtung. Bei der Milz war eine relative Vergrößerung einzelner Lymphfollikel wahrzunehmen. Bei der Leber ließen sich zahlreiche Leberzellnekrosen sowie großtropfige Fettdegenerationen beobachten. Die periportalen Felder erwiesen sich jedoch mit Bezug auf eine Zellaktivierung als unauffällig.

Die Tiere der Gruppe K_{CF} zeigten eine relative Verbreiterung der Nebennierenrinde zuungunsten des Markes mit Verstärkung der Nebennierenrinde um etwa die Hälfte im Vergleich zum Normalen. Infiltrationen von Rindenanteilen in das Mark waren nicht festzustellen. Mark und Rinde waren deutlich voneinander abgegrenzt. Außerdem ließ sich eine etwas verstärkte Granulierung der Rindenzellen und eine großtropfige fettige Degeneration, vor allem in den Randpartien beobachten. Auch konnten dort stärkere Kernabsiedlungen sowie eine Hypertrophie der bindegewebigen Kapselzone erkannt werden. Die Milz dieser Tiere ließ eine relative Vergrößerung der lymphatischen Milzfollikel erkennen. Bei der Leber zeigten sich mäßig viele Leberzellnekrosen sowie vereinzelt verstärkte periportale Infiltrationen (vgl. Abb.5 - 10).

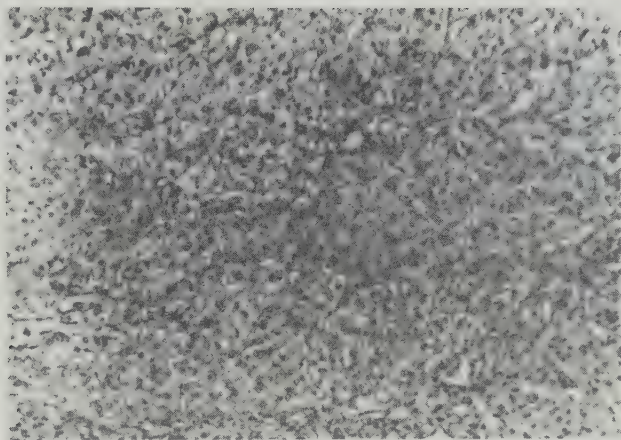


Abb. 5: Schnitt durch eine Kaninchen Nebenniere eines nur mit FREUNDSchem Adjuvans behandelten Tieres. Ausschnitt mit Darstellung des Markes und angrenzenden Rindengewebes. Normale Relation von Rinde und Mark (wie das auf der Übersicht zu sehen ist). Deutlich ausgeprägte Gewebsschicht.

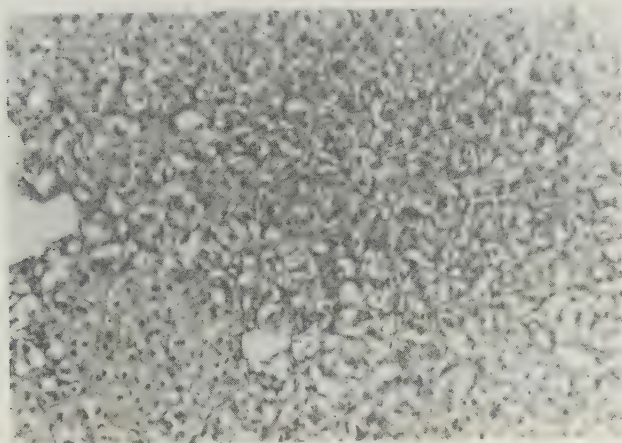


Abb. 6: Nebennieren eines nur mit Cortrosyn behandelten Kaninchens. Ausschnitt aus dem Nebennieren-Mark mit Darstellung insulärer infiltrierter Rindenzellen.

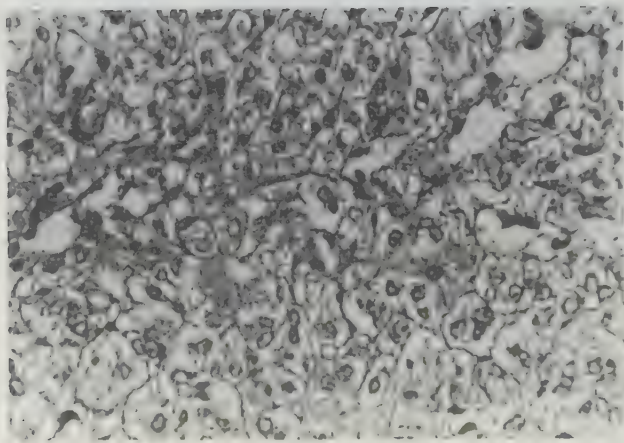


Abb. 7: Nebennierenrinde eines mit Cortrosyn behandelten Tieres. Darstellung der deutlich intensivierten Granulierung der Rindenzellen.



Abb. 8: Histologisches Bild einer Kaninchenmilz mit relativ vergrößerten Follikeln, hier bei einem mit FREUNDschem Adjuvans behandelten Tier.

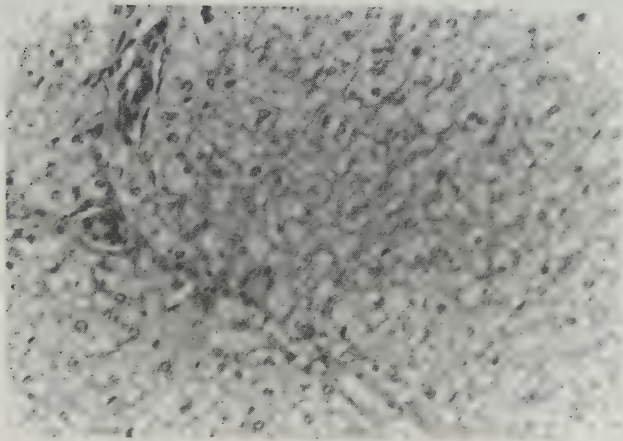


Abb. 9: Normale Kaninchenleber. Auffällig ist hierbei das physiologische Auftreten doppelkerniger Zellen.

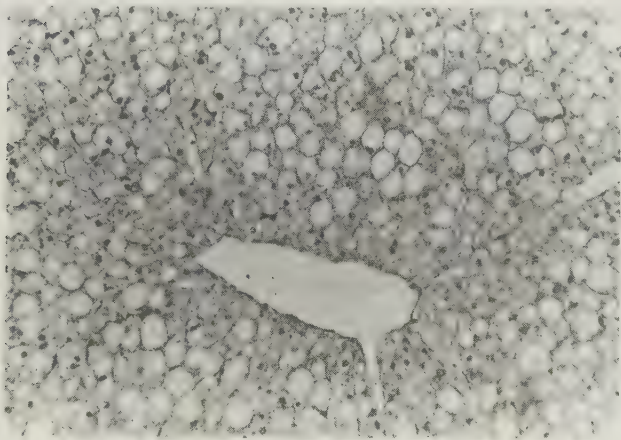


Abb. 10: Kaninchenleber nach Behandlung des Tieres mit hohen Dosen eines ACTH-Präparates. Man erkennt deutlich die großtropfige Verfettung der Leberzellen.

DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß ACTH ohne und mit FREUNDSchem Adjuvans, intramuskulär und über einen Zeitraum von vier Wochen mit insgesamt acht Injektionen appliziert, in keinem Fall einen sensibilisierenden bzw. allergisierenden Effekt ausübt. Dies konnte einerseits gesichert werden durch den negativen Ausfall der verschiedenen Reaktionen zum Nachweis zirkulierender Antikörper, andererseits durch den negativen Ausfall der Cutanreaktion.

Die bei der Kontrolle am Ende der Beobachtungszeit nachweisbare positive Hämagglutinationsreaktion bei den Tieren der Gruppe K_C sowie K_{CF} mit Titerhöhen von 1 : 2 und 1 : 4 ist unseres Erachtens zu vernachlässigen, da nach allgemeiner Übereinkunft erst Agglutinationswerte von 1 : 32 als pathologisch gelten. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Agglutinationsphänomen um unspezifische Konglomeratbildungen der Erythrozyten durch Lipide.

In der einschlägigen Literatur (23) wird auf Grund klinischer Erfahrungen mehrfach über eine sensibilisierende Wirkung von ACTH-Präparaten mit Erfolgsreaktionen vom Soforttyp mit dem klinischen Äquivalenten einer Urticaria, eines Bronchospasmus, eines angio-neurotischen Ödems bis zu schweren, ja sogar tödlichen peripheren Kreislaufkrisen (3, 5, 9, 25), sowie mit der Reaktion vom verzögerten Typ berichtet. Es ist jedoch nicht wahrscheinlich, daß der sensibilisierende

Effekt durch das Hormon hervorgerufen wurde, sondern daß die Antikörperbildung gegen spezies- und individualspezifische Faktoren gerichtet waren. Dies erklärt sich damit, daß in den meisten Mitteilungen biologische, d.h. tierische ACTH-Präparate angewendet wurden. In der neueren Literatur beschreibt EL-SHABOURY (4), daß Patienten, die gegen natürliches ACTH überempfindlich reagiert hatten, keinerlei allergisch-hyperergische Reaktionen auf das synthetische Präparat zeigten. ACTH stellt zwar, ungeachtet seines Herstellungsmodus, d.h. auch als synthetisches Präparat, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 10.000 (1, 14) und einer Aminosäuresequenz von 39 dar, von welchen allerdings nur die ersten 19 (15) bis 24 Aminosäuren für die typischen adrenocortropen Eigenschaften verantwortlich sind. Somit wäre die Proteinatur als Voraussetzung für eine antigene Wirkung ohne weiteres gegeben. Auf Grund von Erfahrungstatsachen aus der experimentellen Immunologie scheinen derartige niedermolekulare Proteine jedoch nicht fähig zu sein, die immunologisch kompetenten Zellen zu einer spezifischen Antikörperbildung zu stimulieren. ACTH würde somit allenfalls als Hapten wirksam sein. Es verhält sich gegenüber dem menschlichen Organismus stärker heterolog als gegenüber bestimmten Tierspezies.

Eine antigene Wirksamkeit von ACTH erscheint aber unseres Erachtens schon deshalb zweifelhaft, weil

dieses Hormon durch seine Sofortwirkung auf die peripheren Nebennieren und die damit wahrscheinlich einhergehenden biochemischen Abbauvorgänge am ACTH-Molekül im Blut nur kurzfristig zirkuliert und infolgedessen die antikörperstimulierenden Zellen, sogenannte Messenger-cells, eines Organismus nur flüchtig berührt. Dafür spricht unter anderem die Tatsache, daß die Konzentration des ACTH im peripheren Blut eines Gesunden unter 0,5 Millieinheiten* je 100 ml liegt (22). Dafür spricht weiterhin die im Tierexperiment erhobene Feststellung, daß die Halbwertszeit eines i.v.-injizierten ACTH-Präparates etwa 5 min. beträgt (7).

Die Verschiebungen in der Relation der Serum-eiweißkörper, die in beiden Gruppen und sogar gering auch bei dem Kontrolltier gefunden wurden, waren insgesamt nicht tiefgreifend. Möglicherweise stehen sie im Zusammenhang mit einem antianabolen Effekt des ACTH über die Corticosteroidaktivierung, wahrscheinlicher ist aber, daß sie als Folge der wiederholten Blutentnahmen aufzufassen sind. Die Gammaglobulinfraktion, die unter der Wirkung von Corticoiden in besonderer Weise über eine Hemmung γ -Globulin- bzw. antikörperbildender Zellen von dem Abbau betroffen sein müßte,

* 1 Internationale Einheit (UNO 1951) = Aktivität von 1 mg des internationalen Standardpräparates = Aktivität von 1 mg des ARMOUR-Präparates La-1-A, 1944 dargestellt von MUNSON et al. (17). Aktivität gemessen mit dem Ascorbinsäuretest nach SAYERS et al. (19)

hat sich in den vorliegenden Studien als völlig normal erwiesen, in Einzelfällen ist sie sogar relativ verstärkt in Erscheinung getreten.

Die Feststellung, daß die Kaninchen, die ausschließlich ACTH appliziert bekamen, sowohl eine Hyperlipämie mit relativer Hypercholesterinämie sowie einer Hyperglycämie im Verlaufe der Behandlung aufwiesen, entspricht der geläufigen Wirkung von ACTH im Sinne einer Stimulierung der Nebennierenrindentätigkeit. ACTH wirkt fettmobilisierend (12) mit Auftreten einer vorübergehenden Ketosis. Die Beobachtung, daß im Verhältnis zum Anstieg der Gesamtlipide das Gesamtcholesterin weniger ansteigt, mag damit zu erklären sein, daß ACTH unter anderem die Nebennierenphosphorylase stimuliert, die eine Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon bewirkt (8).

Ebenso ist die diabetogene, insulinantagonistische Wirkung des ACTH hinlänglich bekannt.

Im Vergleich zu den nur mit Cortrosyn behandelten Tieren zeigten die Kaninchen der Gruppe K_{CF} weit weniger intensive Reaktionen mit Bezug auf Hyperlipämie und Hyperglycämie. Der Grund hierfür dürfte darin liegen, daß die an sich gleiche Dosis von Cortrosyn durch die Mischung mit FREUNDSchem Adjuvans nach i.-m.-Applikation längere Zeit im Gewebe festgehalten und nur in kleinen Dosen successive liberiert worden ist. Der Anstieg der Lipide war wesentlich flacher und erreichte weniger hohe Werte als in der

Gruppe der Tiere K_c . Dasselbe gilt im Prinzip für die Blutzuckerhältnisse, die bei den Tieren K_{CF} nahezu normale Schwankungsbreiten aufwiesen*.

Die makroskopisch und histologisch faßbaren geweblichen Veränderungen vor allem an Nebennieren und Leber sind im Falle nur mit Cortrosyn behandelter Tiere typisch für den ACTH-Wirkungsmechanismus. Überraschend ist lediglich die Feststellung, daß die verhältnismäßig starken Auswirkungen auf die genannten Organe in relativ kurzer Zeit aufgetreten sind. Es scheint eine strenge Korrelation zwischen applizierter Dosis und der Intensität der Organveränderungen zu bestehen.

Die praktische Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse kann folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Das verwendete synthetisch hergestellte ACTH-Präparat, ein Tetracosactid-Zink-Komplex als depotfähiges Präparat läßt Wirkungen erkennen, wie sie den biologischen Effekten eines natürlichen, gereinigten ACTH-Präparates entsprechen.

Es ist jedoch anzunehmen, daß, unter Berücksichtigung der in der Humanmedizin verwendeten wesentlich niedrigeren Dosen unerwünschte Nebeneffekte wie Hyperlipämie, Corticoiddiabetes, Insuffizienz des immunologisch aktiven Zellsystems und Mineralhaushaltstörungen nicht

* Hierzu ist zu bemerken, daß bei Kaninchen die Blutzuckerwerte um 80 - 100 mg% niedriger liegen als beim Menschen.

oder nur geringfügig auftreten werden. Dies geht schon daraus hervor, daß die im Tierexperiment unter Beweis gestellten Unterschiede in der Wirkungsweise des mit FREUNDSchem Adjuvans gemischten und des isoliert applizierten ACTH-Präparates offensichtlich dosisabhängig waren. Eine antigene Wirkung kommt dem geprüften Präparat nicht zu.

ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit wurden insgesamt 5 Kaninchen in Versuch genommen. Zwei von diesen Tieren wurden mit Cortrosyn (K_{C1} , K_{C2}), zwei weitere mit dem Emulgat aus Cortrosyn und FREUNDschem Adjuvans (K_{CF1} , K_{CF2}) behandelt, das fünfte Kaninchen erhielt nur FREUNDsches Adjuvans (K_F) appliziert.

Vor Versuchsbeginn, sowie in Abständen von jeweils 14 Tagen wurden den Tieren aus einer Ohrvene etwa 7 ml Blut entnommen, zentrifugiert und das hämolysefreie Serum folgenden Untersuchungen unterworfen: Zweidimensionale Immunodiffusion, passive Hämagglutination, Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien (CAF) sowie Immuno~~o~~elektrophorese. Außerdem wurden sämtliche Tierseren auf ihren Gehalt an Lipiden und Blutzucker analysiert. Bei allen Tieren wurde bei jeder Kontrolluntersuchung der Intracutantest durchgeführt.

Nach Abschluß der Sensibilisierungsserie wurden die Tiere noch weitere zwei Wochen ohne Behandlung beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurden nochmals sämtliche Serumanalysen vorgenommen. Schließlich wurden die Tiere getötet und Nebennieren, Milz und Leber für die histologische Befundung entnommen. Als Ergebnis der Untersuchungen konnte folgendes festgestellt werden:

Eine antigene bzw. sensibilisierende Wirkung des

synthetisch hergestellten ACTH-Präparates konnte bei keinem der behandelten Tiere festgestellt werden. Dagegen zeigten sich bei den mit hohen Dosen Cortrosyn behandelten Kaninchen Befunde wie Hyperlipämie, Hyperglycämie bei entsprechenden morphologisch faßbaren Veränderungen an Nebenniere und Leber, die auf die bekannten biologischen Wirkungen von ACTH zurückzuführen sind.

LITERATUR

- 1.) BEHRENS, O.K. u. W.W.BROMER: Biochemistry of the protein hormones.
Ann.Rev.Biochem. 27, 57 (1958).
- 2.) BOYDEN, S.V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera.
II.Exp.Med. 83, 107-112 (1952).
- 3.) EISALO, A. et al.: Fatal anaphylactic shock following corticotrophin.
Acta med.scand. 155, 1 (1956).
- 4.) EL-SHABOURY, A.H.: Effect of a synthetic corticotropic polypeptide on adrenal function in hypersensitive asthmatics.
Lancet No. 7380, 298-301 (1965 I).
- 5.) FEINBERG, S.M. et al.: Allergy to pituitary corticotrophic hormone.
J.Amer.med.Ass. 147, 40 (1951).
- 6.) GRABAR, P. u. C.A.WILLIAMS: Methode permettant l'etude conjugee des proprietees electrophoretiques et immunochimiques d'un melange de proteines; application au serum sanguin.
Biochim.biophys.Acta 10, 143 (1953).
- 7.) GREENSPAN, F.S. et al.:
Disappearance rate of adrenocorticotrophic hormone from rat's plasma after intravenous injection.
Endocrinology 46, 261 (1950).
- 8.) HAYNES, R.C.: Activation of adrenal phosphorylase by ACTH.
Fed.Proc. 17, 376 (1958).

- 9.) HILL, B.H.R., P.D.SWINBURN: Death from corticotrophin.
Lancet, i, 1218 (1954).
- 10.) HUNGER, A.: Formulierung und Analytik von ACTH-Präparaten.
Pharmazeutische Zeitung 36, 1351-1355 (1968).
- 11.) KAPPELER, H. u.R.SCHWYZER: Die Synthese eines Tetra-
cosa-peptids mit der Aminosäuresequenz eines
hochaktiven Abbauproduktes des β -Corticotropins
(ACTH) aus Schweinehypophysen.
Helv.chim.Acta 44, 1136 (1961).
- 12.) KLINGMÜLLER, V.:
Die Physiologie des adrenocorticotropen Hormons.
Arzneimittelforschung 1, 55-63 (1951).
- 13.) KOHN, J.: Elektrophorese auf Celluloseacetatfolien.
Nature 182, 312 (1961).
- 14.) LI, C.H.: Hormones of the anterior pituitary gland-
part.I growth and adrenocorticotropic hormones.
Advanc.Protein Chem. 11, 101 (1956).
- 15.) LI, C.H. et al.: The synthesis of a nonadecapeptide
possessing adrenocorticotropic and melanotropic
activities.
J.Amer.chem.Soc. 82, 5760 (1960).
- 16.) LI, C.H., M.E.SIMPSON, H.M.EVANS: Isolation of adreno-
corticotropic hormone from sheep pituitaries.
Science 96, 450 (1942).
- 17.) MUNSON, P.L. et al.: Pituitary preparations more
potent than electrophoretically homogeneous
adrenocorticotropic hormone (ACTH).
Fed.Proc. 9, 208 (1950).

- 18.) OUCHTERLONY, Ö.: Antigen and antibody reaktions in gels.
Acta path.microbid.scand. 26, 507 (1949).
- 19) SAYERS, G. et al.: Preparation and properties of pituitary adrenotropic hormone.
J.Biol.Chem. 149, 425 (1943).
- 20.) SCHEIDEGGER, J.J.: Une micro-methode de l'immun-elektrophorese.
Int.Arch.Allergie 7, 103 (1955).
- 21.) SMITH, P.E.: Ablation and transplantation of the hypophysis in the rat.
Anat.Record 32, 221 (1926).
- 22.) SNYDOR, K.L. et al.: Preliminary studies on blood ACTH in man.
J.clin.Endocr. 13, 891 (1953).
- 23.) THORN, G.W. et al.: Pharmacologic aspects of adrenocortical steroids and ACTH in man.
New.Engl.J.Med. 248, 588 (1953).
- 24.) TYSLOWITZ, R.: Corticotropin obtained by ultra-filtration of pituitary extracts.
Science 98, 225 (1943).
- 25.) WILSON, L.A.: Protein shock from intravenous ACTH.
Lancet, ii, 478 (1951).

Herrn Prof.Dr.med.F.Scheiffarth möchte ich herzlich danken für die Überlassung des Themas, die in Freundlichkeit erteilten Ratschläge sowie für die Übernahme des Referates.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Frl.Priv.-Doz. Dr.H.Götz, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, aussprechen.

LEBENS LAUF

Am 3.11.1941 wurde ich, Karl Cerny, als drittes von drei Kindern des Zahnarztes Karl Cerny und seiner Ehefrau Berta, geb. Hillermeier, in Öhringen (Württ.) geboren.

Von 1948 bis 1952 besuchte ich die Volksschule und anschließend bis 1961 das Gymnasium in Öhringen, wo ich am 15. März 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Mein zahnmedizinisches Studium begann ich im Sommersemester 1961 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, wo ich im Frühjahr 1964 das Physikum bestand und am 15. März 1967 das zahnmedizinische Staatsexamen ablegte.

Seit April 1967 bin ich als Zahnarzt in Nürnberg tätig.



LUDWIG MÖLLER
BUCH- UND FOTODRUCK
ERLANGEN FAHRSTR. 5